ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.02772v1

产油微生物粘红酵母胞内代谢物提取研究

崔应龙

(北京市广渠门中学

指导教师 王炳武

北京化工大学生命科学与技术学院

王乙

北京市广渠门中学)

摘　要：粘红酵母是重要的产油微生物之一，有的种属油脂含量可以达到其干重的 70%。其胞内代谢物中包含大量可加工生产生物柴油的相关物质，如游离脂肪酸、甘油三酯等。本文主要以超声破碎法（即空化作用）提取粘红酵母胞内代谢物，利用气相质谱联用方法检测各物质，通过归一化法计算各物质含量，并对所得数据进行处理与分析，寻找最合适提取胞内代谢物的方法，针对不同种类胞内代谢物找出相应的实验条件和提取方法。

关键词：粘红酵母；胞内代谢物；超声破碎提取

1、引言

随着全世界环境污染日益严重以及石化资源消耗需求日益增大，现在对于新能源的开发有着很大的热度，也是当今世界的重要研究热点。新能源是相对于传统石化资源的非传统能源，如太阳能、风能、地热能及生物质能等。生物柴油是新能源的一种，它燃烧性能好，含硫量低，可代替化石燃料，是一种可再生绿色新能源[1]。目前全球生产的生物柴油主体还是以动植物油脂为原料，据统计，2016 年度全球生物油生产中，仅食用植物油产量预计达到 1.86 亿吨，同比增长 5.1%。仅能满足人口食用，不足以大规模生产生物柴油。微生物油脂脂肪酸成分与植物油类似，可用于生产生物柴油，且微生物油脂制备生物柴油有以下三点优势：1、微生物代谢快，培养周期短，油脂含量高；2、微生物不受季节影响，一年四季均可生产无需间断；3、微生物适应性强，几乎多数恶劣环境下均可生存，有些甚至可以在盐碱湖、滩涂和生活污水中生长。因此大力研究微生物油脂，为生物柴油提供量大而廉价的原料具有广阔的发展前景[2]。

自然界中，有一些微生物细胞内贮存的油脂含量超过其细胞干重的 20%，这类微生物被称为产油微生物。产油微生物主要包括产油微藻、霉菌和酵母[3]。粘

红酵母是产油酵母的一种，又叫红酵母，属半知菌纲，壳霉目，杯霉科。细胞圆形、卵形或长形。粘红酵母油脂含量较高，可利用各种碳源和氮源，具有较强的环境适应性，是良好的产油菌种[4]。粘红酵母细胞内代谢物种类很多，包括蛋白质、油脂及多糖等等，但是由于粘红酵母自身细胞壁较厚，其胞内代谢物不易释放到提取介质中，故而需要一定的方法使其细胞壁被破坏让其胞内代谢物被释放出来。粘红酵母胞内代谢物的不同提取方法均可影响所提取物质的含量。本文以超声破碎法（即空化作用）进行胞内代谢物提取，利用 GC-MS 法对胞内代谢物进行检测，在不同提取条件下，监测粘红酵母胞内代谢物中各物质的含量变化，并对数据进行分析，找到相对高提取率的提取方法。

2、实验方法

2.1 仪器与试剂

超声波破碎仪（宁波新芝，SCIENTZ-ⅡD）；涡旋振荡器（HQ-60-Ⅱ）；气相质谱联用仪（GC-MS，岛津 GC-MS-QP2010，日本）；甲醇（分析纯）；核糖醇（内标物，纯度＞95%）。

2.2 菌种和培养条件

粘红酵母培养基成分为：40 g/L 葡萄糖；7 g/L KH_2PO_4；2 g/L $(NH_4)_2SO_4$；2 g/L Na_2SO_4；1.5 g/L $MgSO_4$；1.5 g/L 酵母粉。因为光照对粘红酵母油脂合成和生长有影响，所以采用三种培养条件（光照 A、光照+黑暗 B、黑暗 C）培养粘红酵母进行后续提取实验。200 mL 培养基为培养体系，接种量为 10%，采用 4 根 LED 灯管进行光照，光照+黑暗条件采用 12h 光照+12h 黑暗处理，黑暗条件采用锡箔纸包裹锥形瓶进行处理，培养条件为 30℃，180rpm。

2.3 培养后菌体处理

菌体培养 5-6 天后收获菌体，将菌液在 8000rpm 下离心 10min，去除上清液后收集菌体细胞，再利用磷酸缓冲液洗涤菌体 2-3 次，最后倒入液氮快速将细胞淬灭，防止其再次代谢产生次级代谢物。淬灭后的细胞利用冷冻干燥制得干菌体留作后续实验用。

2.4 不同提取条件提取粘红酵母胞内代谢物

分别取 9 份酵母粉 0.1 g 置于 7 mL 离心管中，加入 2.5 mL 60%甲醇-水溶液中。用涡旋振荡器混合均匀，将 9 个离心管分别标号为①-⑨。

（1）不同功率；

chinaXiv:201711.02772v1

将①在 20min 下，功率为 50W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

将②在 20min 下，功率为 100W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

将③在 20min 下，功率为 150W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

（2）不同破碎时间；

将④在 10min 下，功率为 150W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

将⑤在 20min 下，功率为 150W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

将⑥在 30min 下，功率为 150W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

（3）不同工作时间；

将⑦在 20min 下，功率为 150W，开-关时间为 3s-5s 下进行超声破碎。

将⑧在 20min 下，功率为 150W，开-关时间为 4s-6s 下进行超声破碎。

将⑨在 20min 下，功率为 150W，开-关时间为 2s-4s 下进行超声破碎。

2.5 GC-MS 检测

将超声处理后的菌体在 8000rpm 下离心 5min，取出上清液，加入 10 μL 核糖醇溶液作为内标物，然后经过甲氧胺吡啶溶液和 MSTFA 溶液进行衍生化，之后进入气相质谱联用仪进行分析。

3、结果与讨论

3.1 三种不同培养条件下粘红酵母胞内代谢物对比分析

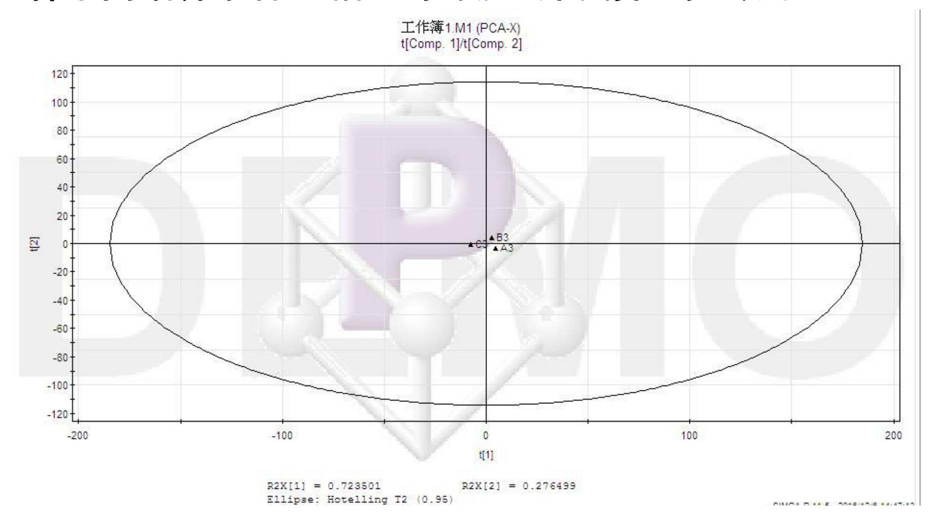


图 1　三种不同培养条件下粘红酵母胞 A、B、C 其内代谢物含量对比图

通过超声破碎提取三种条件下培养得到的粘红酵母胞内代谢物，接着用 GC-MS 分析胞内代谢物种类，用内标物归一化法确定了各物质的浓度。之后将数据导入 SIMCA 软件（SIMCA 12.0）进行分析，其 PCA 分析结果如图 1 所示。

chinaXiv:201711.02772v1

我们可以看到 A、B、C 三种菌体代谢物有显著差异，在 PCA 图中位于不同象限中，说明胞内代谢物显著差异，可以用于后续胞内代谢物提取实验。

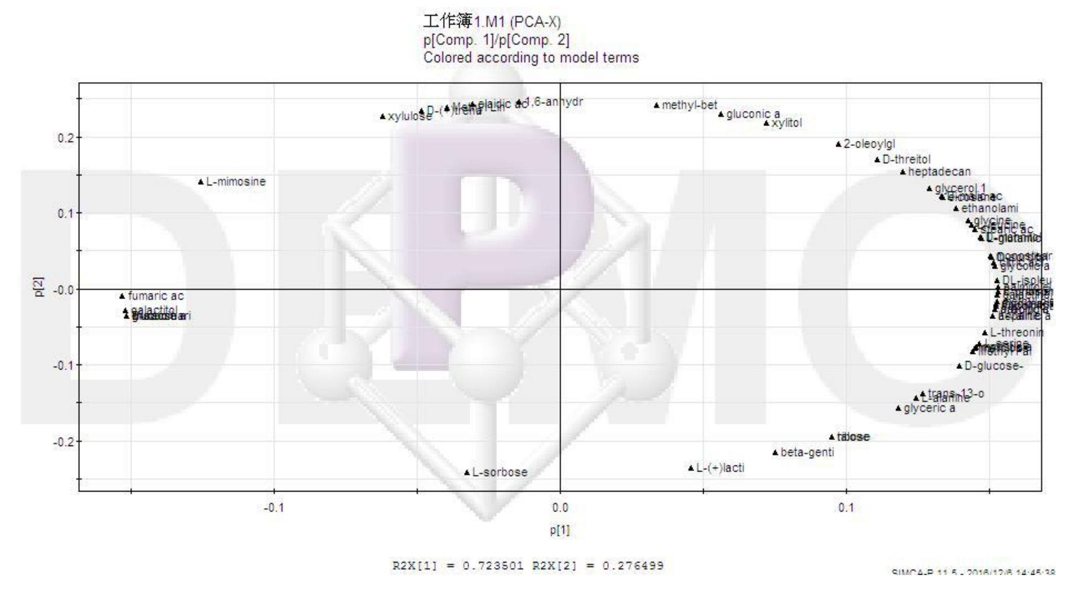
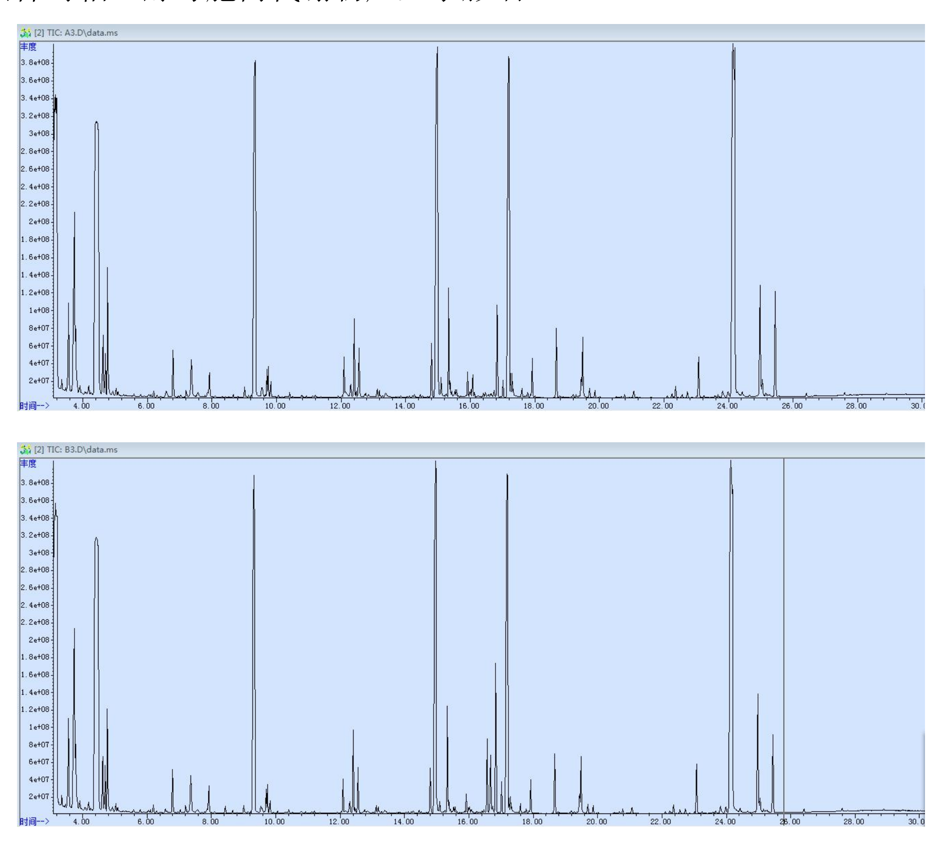


图 2　三种培养条件下粘红酵母胞内代谢物差异图

图 2 为用 SIMCA 软件分析得到的三种条件下粘红酵母胞内代谢物差异图，可以看出四个象限中均有代谢物分布，且胞内代谢物都不同，也说明了三种不同培养条件对粘红酵母胞内代谢物产生了影响。



chinaXiv:201711.02772v1

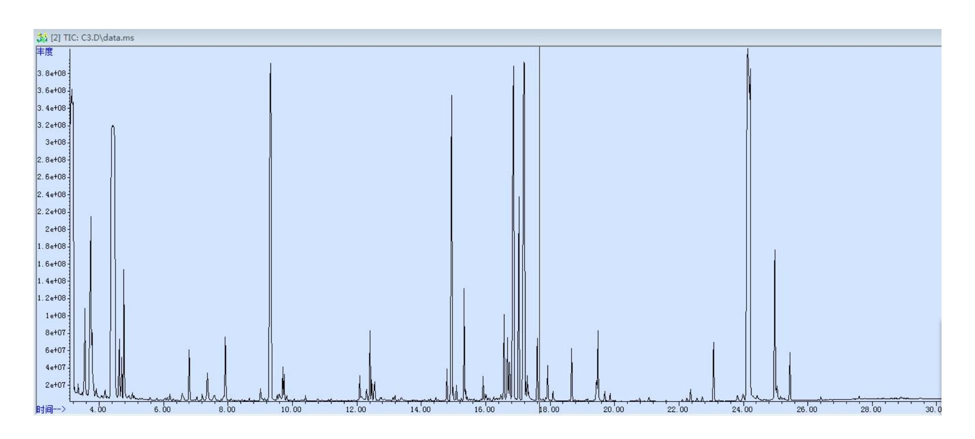


图 3 三种培养条件下粘红酵母胞内代谢物 GC-MS 检测结果图

根据实验前所查阅的资料及实验预测，可知粘红酵母胞内代谢物主要包括氨基酸、有机酸、多糖及油脂。实验结果也与预测结果相同，粘红酵母胞内代谢物代谢物主要包括氨基酸、有机酸、多糖及油脂，对比三种不同培养条件下生长出的粘红酵母其胞内代谢物的含量丰度值以及三种粘红酵母胞内代谢物的标准偏差值，分析出不同实验条件对粘红酵母胞内代谢物有显著影响，对后续实验有指导作用。

3.2 不同提取条件下粘红酵母胞内代谢物对比分析

通过 2.4 中设置的不同提取条件对粘红酵母胞内代谢物进行提取，之后利用 GC-MS 进行分析。粘红酵母胞内代谢物不同提取方法所得的细胞内液经气质分析后所得原始数据再使用 AMDIS 软件进行数据整理，分别将九种方法提取出的胞内代谢物各组成成分依次列表。可知其中总共有约 250 中胞内代谢物质，最终筛选出 70 种所需研究物质。

使用内标法进一步处理数据，得到相应格式，并利用 SIMCA 以及 AMDIS 图像化，进行分析。

chinaXiv:201711.02772v1

chinaXiv:201711.02772v1

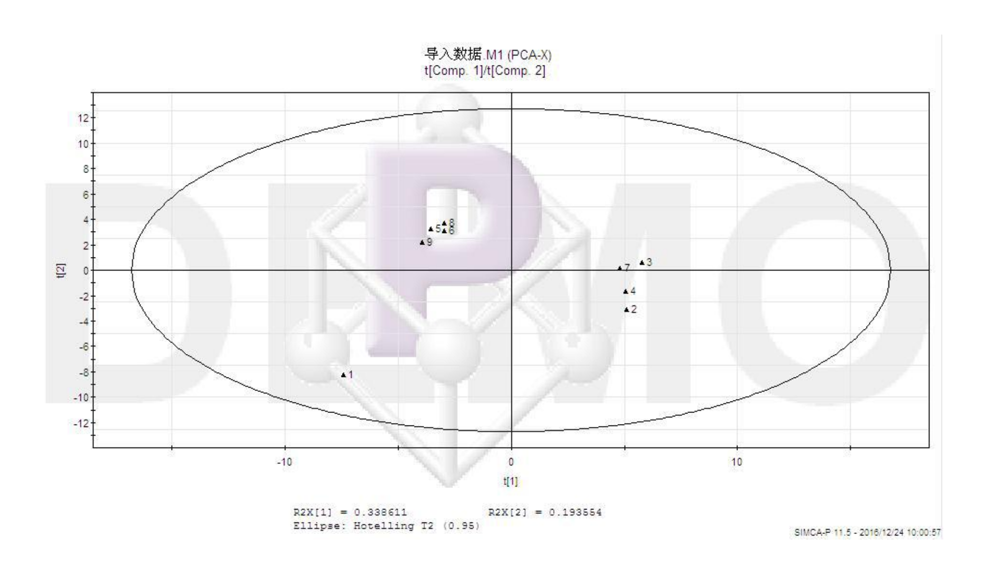


图 4　9 种提取方法提取粘红酵母胞内代谢物 PCA 分析结果图

图 4 为得到气质数据经过 SIMCA 分析结果，使用 PCA 方法分析后可得知九种提取方法对胞内代谢物提取有明显差距。5、6、8、9 处于第二象限，1 单独处于第三象限，3、7、2、4 处于第一和第三象限，可以看出九种不同提取条件分为了三类，说明不同超声提取条件的确对胞内代谢物提取产生了影响。

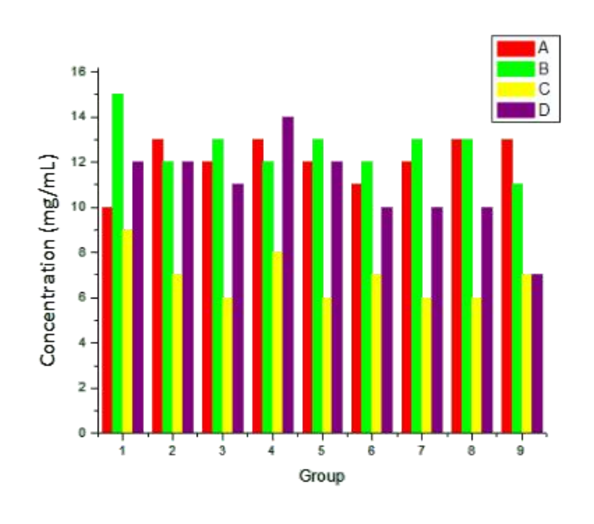


图 5　9 种提取方法下粘红酵母胞内代谢物各物质含量图

（A 氨基酸；B 有机酸；C 油脂；D 多糖）

图 5 为气质结果获得的四种主要胞内代谢物组分含量图，可以发现不同提取条件对于四种胞内物质的提取效果不同，含量差异较大，分析原因可能是超声破碎条件不同，对于粘红酵母细胞壁的破坏程度也不同，所以胞内代谢物释放程度也不同。

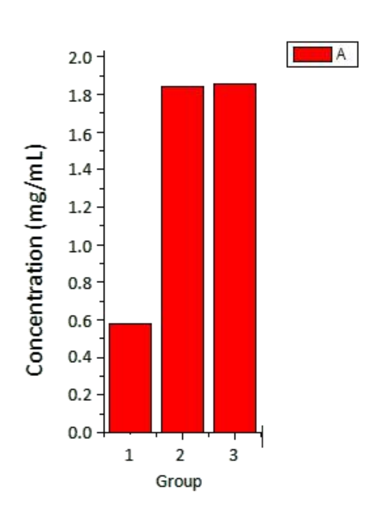


图 6　不同功率下粘红酵母胞内氨基酸含量图

图 6 为不同功率得到的胞内有机酸含量图。由图可以看出，1、2、3 三种提取条件对于胞内氨基酸提取效果为递增趋势，其中 2、3 具有较高的提取效率，而 1 这种提取方法对于胞内氨基酸提取效果较差，分析原因可能是因为功率没有达到一定强度，其破壁效果较差，无法较好的将粘红酵母细胞壁破坏。

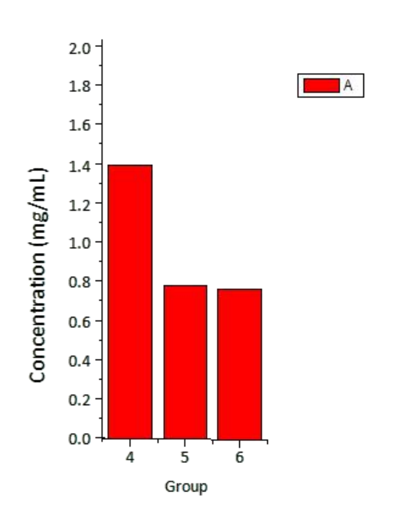


图 7　不同破碎时间下粘红酵母胞内氨基酸含量图

图 7 为不同破碎时间得到的胞内有机酸含量图。由图可看出 4、5、6 三种提取条件对于胞内氨基酸提取效果为单调递减趋势，其中 4 具有较高的提取效率，而 5、6 这两种提取方法对于胞内氨基酸提取效果较差，分析原因可能是因为破碎时间过长，使胞内某些代谢物质被破坏。

chinaXiv:201711.02772v1

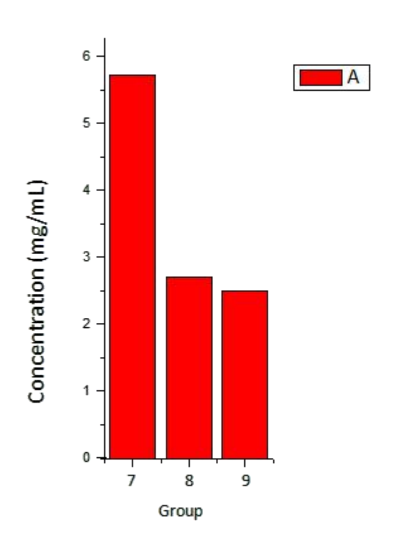


图 8　不同工作时间下粘红酵母胞内氨基酸含量图

图 8 为不同工作时间得到的胞内有机酸含量图。由图可看出 7、8、9 三种提取条件对于胞内氨基酸提取效果为单调递减。其中 7 具有较高的提取效率，而 8、9 这两种提取方法对于胞内氨基酸提取效果较差，分析原因可能是因为工作的开关时间的不同其破壁效果较差，无法较好的将粘红酵母细胞壁破坏。

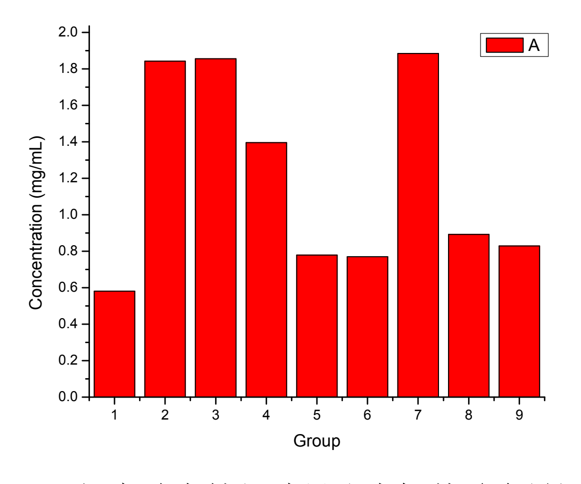


图 9　三组实验中粘红酵母胞内氨基酸含量图

图 9 为检测到的胞内代谢物中氨基酸含量结果图。由图可以看出，2、3、7 三种提取条件对于胞内氨基酸提取效果较好，具有较高的提取效率，而 1、5、6、8、9 五种提取方法对于胞内氨基酸提取效果较差，分析原因可能是因为其破壁效果较差，无法较好的将粘红酵母细胞壁破坏。由此可为以后进行研究人员对于提取粘红酵母胞内氨基酸的最适条件提供一定参考范围。

chinaXiv:201711.02772v1

chinaXiv:201711.02772v1

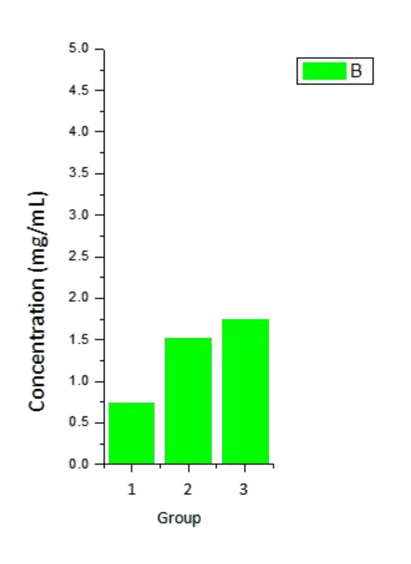


图 10　不同功率下粘红酵母胞内有机酸含量图

图 10 为不同功率得到的胞内有机酸含量图。由图可以看出提取条件 1、2、3 对于胞内有机酸提取效果呈现单调递增趋势，其中 3 的提取效果最好，1、2 的提取效果较差，分析它可能是由于破碎时功率不够一定强度，其破壁效果较差，无法较好的将粘红酵母细胞壁破坏。

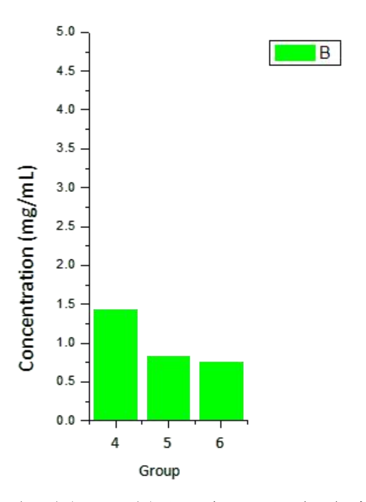


图 11　不同破碎时间下粘红酵母胞内有机酸含量图

图 11 为不同破碎时间得到的胞内有机酸含量图。由图可以看出提取条件 1、2、3 对于胞内有机酸提取效果呈现单调递减趋势。其中 4 的效果最好，5、6 的效果较差，分析其原因可能是由于破碎时间过长导致包内某些有机酸结构被破坏。

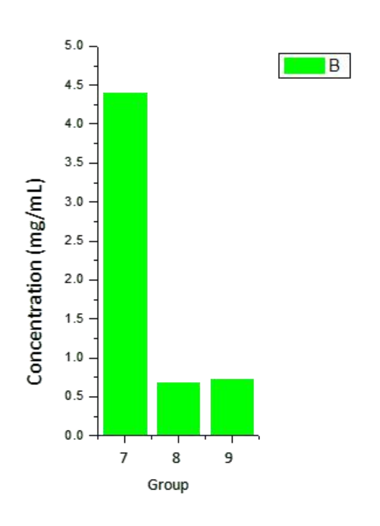


图 12　不同工作时间下粘红酵母胞内有机酸含量图

图 12 为不同工作时间得到的胞内有机酸含量图。由图可以看出这三种提取条件下，提取效果其中 8 为最差，9 次之，7 效果明显高于后两者。由此可分析 7 这种工作时间可能对于胞内有机酸的提取更加适宜，对有机酸没有过多破坏影响。

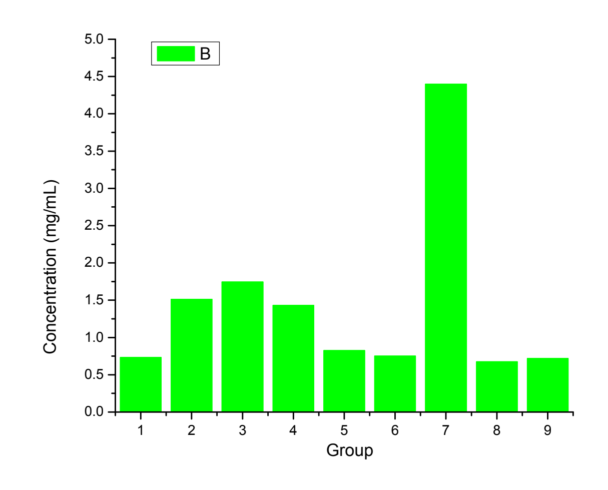


图 13　三组实验粘红酵母胞内有机酸含量图

图 13 为三组实验得到的胞内有机酸含量图，综合对比三组实验结果，可发现 7 的效果明显远高于其他八种方法。由此分析，工作时间对于胞内有机酸的提取与对于细胞壁的破坏有着较大的影响。

chinaXiv:201711.02772v1

chinaXiv:201711.02772v1

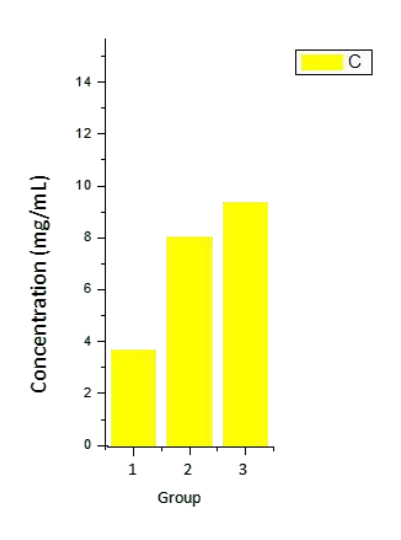


图 14　不同功率下粘红酵母胞内油脂含量图

图 14 为不同功率得到的胞内有机酸含量图。由图可以看出这三种提取效果呈现单调递增趋势。粘红酵母最重要的就是胞内的油脂，可以看出条件 3 对于胞内油脂提取效果最好，说明对细胞壁破坏较充分。

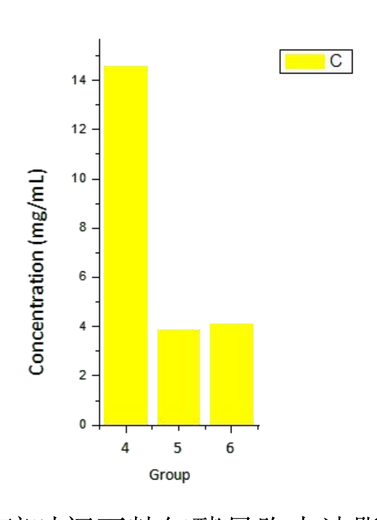


图 15　不同破碎时间下粘红酵母胞内油脂含量图

图 15 为不同破碎时间得到的胞内有机酸含量图。由图中可看出 4 的效果要明显远高于另外两种，可推测 4 的破碎时间能够较好的在完全破坏细胞壁的基础之上对于提取无较大影响。

chinaXiv:201711.02772v1

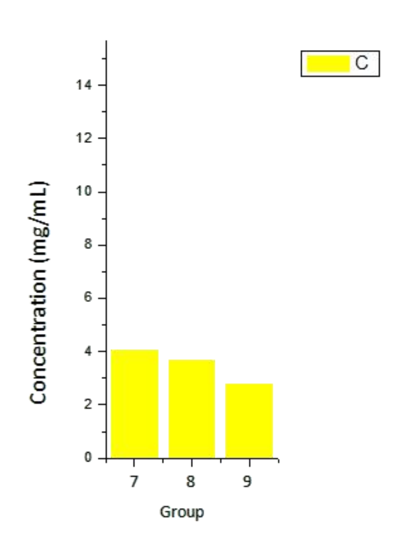


图 16　不同工作时间下粘红酵母胞内有机酸含量图

图 16 为不同工作时间得到的胞内有机酸含量图。图中三种提取效果呈现单调递减趋势，但提取效果差距不大，由此可看出工作时间对于胞内油脂的提取影响不大。

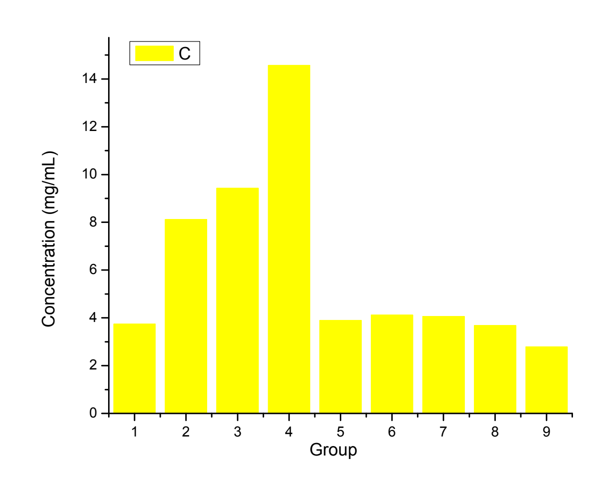


图 17　三组实验粘红酵母胞内油脂含量图

图 17 为三组实验得到的胞内油脂含量图。综合看这三组实验可发现 4 提取方法对于胞内油脂的提取效果最好，其他几种方法基本差距不大，可分析破碎时间对于胞内油脂的活性有所影响。适当的破碎时间能使其中的油脂能够较好的被提取出。

chinaXiv:201711.02772v1

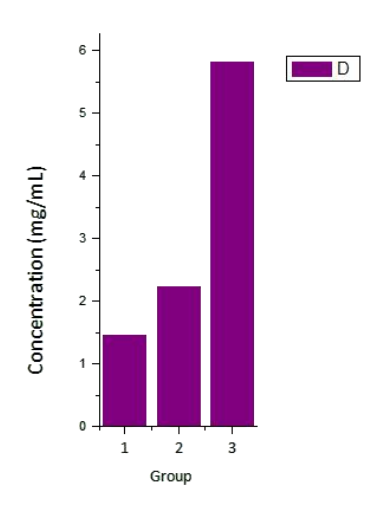


图 18　不同功率下粘红酵母胞内多糖含量图

图 18 为不同功率得到的胞内有机酸含量图。由图可以看出提取方法 3 对于胞内多糖提取效果较好，而其他两种提取效果则相差不大，说明 3 对细胞壁破坏程度最好。

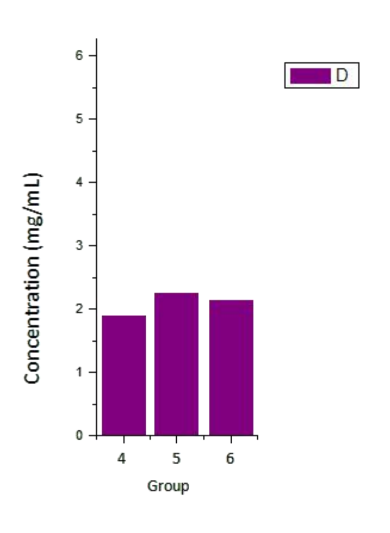


图 19　不同破碎时间下粘红酵母胞内多糖含量图

图 19 为不同破碎时间得到的胞内有机酸含量图。图中三种提取效果呈现正态分布，并且其提取效果差距不大，由此可分析破碎时间的长短对于胞内多糖的影响不大。

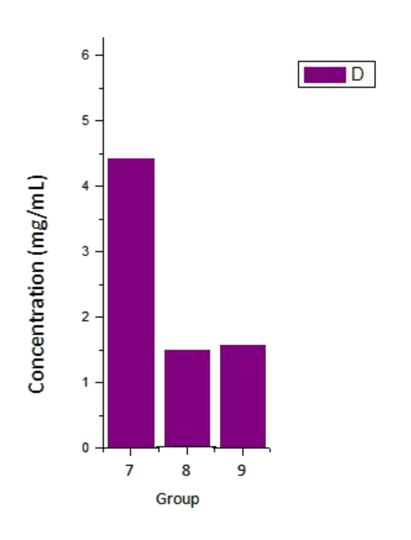


图 20　不同工作时间下粘红酵母胞内多糖含量图。

图 20 为不同工作时间得到的胞内有机酸含量图。其中 7 的提取效果要远高于另外两种，由此判断 7 这种工作时间能够更好地将细胞壁破坏。

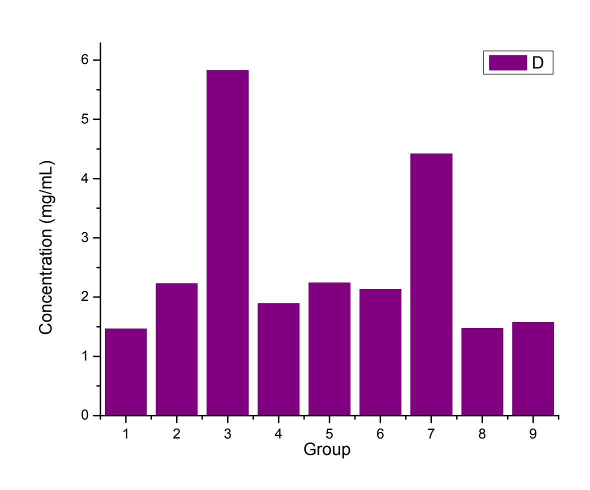


图 9　三组实验粘红酵母胞内多糖含量图

图 9 为三组实验得到的胞内多糖含量图。综合来看这三组实验，可看出 3 和 7 的提取效果要远远高于另外的几中提取效果，由此分析功率以及工作时间对于胞内多糖的提取有着较大的影响，对于能否更好的破碎细胞壁也有着较大的影响。

4、结论

在通过 GC-MS 以及 SIMCA 的数据分析下，可以清楚地发现，三种不同培

chinaXiv:201711.02772v1

养条件对于粘红酵母胞内代谢物含量有很大差异，可以利用三种菌体来进行后续提取实验。实验采用光照条件下培养的粘红酵母菌体作为实验材料，因为光照对于粘红酵母具有促进作用，所以对于粘红酵母胞内代谢物的提取和分析具有显著的意义，加上粘红酵母自身细胞壁较厚，所以采用超声破碎细胞提取粘红酵母胞内代谢物。实验设计了九种不同超声提取条件，对其中的氨基酸、有机酸、油脂和多糖进行了分析比较，对提取不同物质提供了一定的参考价值,为进一步研究粘红酵母合成油脂的代谢过程提供理论基础。

参考文献

[1]Ramalingam SS, Mark Z, Dufrech B, et al. Microbial lipidsfrom renewable resources: production and characterization[J]. Microbiol Biotechol, 2010, 37: 1271-1287.

[2]高春芳，余世实，吴庆余. 微藻生物柴油的发展[J]. 生物学通报，2011，46(6) : 1-6.

[3]赵宗保， 胡翠敏. 能源微生物油脂技术进展[J]. 生物工程学报，2011，27(3) : 427－435.

[4]乔凤杰，李炯书，欧阳亚旭，李意颖，黄永虹，孙宜君，常蓉，李博生. 利用粘红酵母生产微生物油脂研究进展. 北京林业大学，2014，1002-1003.

致谢

感谢龚贵平师兄，王炳武老师以及王乙老师度我的教导。

感谢北京市广渠门中学对我的支持。

感谢北京化工大学为我提供试验的场所与器材和设备。

感谢翱翔计划给予我这次体验学术研究的机会。

The Study of Extracting Intracellular Metabolite in Oil-Producing Rhodotorula Glutinis

Yinglong Cui

(Beijing Guangqumen Middle School

Faculty Adviser　Bingwu Wang

Institute of inorganic chemistry, College of chemistry, Peking University

chinaXiv:201711.02772v1

ChinaXiv合作期刊

Yi Wang

Beijing Guangqumen Middle School)

Abstract *Rhodotorula glutinis is one of the most important oil-producing microorganisms, the oil content of some species can reach 70% of its dry weight. The intracellular metabolites in Rhodotorula glutinis contain a large number of substances which can be used to produce biodiesel, such as free fatty acids and triglyceride. This study used ultrasonication (i.e. cavitation) to extract intracellular metabolites in Rhodotorula glutinis, applied gas chromatography-mass spectrometry method to examine the substances that contained in intracellular metabolites, and employed normalization method to calculate the content of each substance and analyze the data. The purpose of this study is to optimize the intracellular metabolites extracting method, and find suitable experimental conditions and extracting ways for different types of intracellular metabolites.*

Key Words Rhodotorula glutinis； Extracting Intracellular Metabolite； Ultrasonication

chinaXiv:201711.02772v1